

**FABRICATION OF VASCULARIZED TISSUE USING MICROFABRICATED TWO-DIMENSIONAL MOLDS****Publication number:** JP2002542883T**Publication date:** 2002-12-17**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- international:** C12M3/00; A61F2/02; A61F2/04; A61F2/06; A61F2/28; A61L27/38; A61M1/10; C12N5/06; A61K35/12; C12M3/00; A61F2/02; A61F2/04; A61F2/06; A61F2/28; A61L27/00; A61M1/10; C12N5/06; A61K35/12; (IPC1-7): A61F2/02; A61F2/04; A61F2/06; A61F2/28; A61M1/10; C12M3/00; C12N5/06

**- European:** A61L27/38; C12N5/06B14A; C12N5/06T

**Application number:** JP20000614923T 20000428

**Priority number(s):** US19990131930P 19990430; US19990165329P 19991112; WO2000US11407 20000428

**Also published as:**

WO0066036 (A3)

WO0066036 (A2)

EP1187909 (A3)

EP1187909 (A2)

EP1187909 (A0)

more &gt;&gt;

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2002542883T

Abstract of corresponding document: **WO0066036**

A method and materials to create complex vascularized living tissue in three dimensions from a two-dimension microfabricated mold has been developed. The method involved creating a two dimensional surface having a branching structure etched into the surface. The pattern begins with one or more large channels which serially branch into a large array of channels as small as individual capillaries, then converge to one or more large channels. The etched surface serves a template within a mold formed with the etched surface for the circulation of an individual tissue or organ. Living vascular cells are then seeded onto the mold, where they form living vascular channels based on the pattern etched in the mold. Once formed and sustained by their own matrix, the top of the mold is removed. The organ or tissue specific cells are then added to the etched surface, where they attach and proliferate to form a thin, vascularized sheet of tissue. The tissue can then be gently lifted from the mold using techniques such as fluid flow and other supporting material, as necessary. The tissue can then be systematically folded and compacted into a three-dimensional vascularized structure. This structure can then be implanted into animals or patients by directly connecting the blood vessels to flow into and out of the device. Immediate perfusion of oxygenated blood occurs, which allows survival and function of the entire living mass.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

## [Claim(s)]

[Claim 1] The following [ it is a system for producing thin panniculus ] : It is mold equipped with (a) support front face. Are suitable for adhesion and culture of the cell for having the channel of a two-dimensional pattern on it, and forming a lumen in this channel. It has the 0.1-micron suitable degree of separation for the adhesion and culture of one or more of a cell type in the field on this front face surrounding this channel for forming the film of a number cell. And this thickness The system equipped with the mold which is the thickness which may be used for forming lamination organization by being removed from this mold.

[Claim 2] The following [ it is a system according to claim 1 ] (b) System equipped with the connection for circulation of the culture medium which led this mold for culture of the cell which adheres to said mold, and a means.

[Claim 3] It is the system which this channel begins from one or more inlet ports, extends the inside of the further channel, and joins subsequently to in one or more outlets by being a system according to claim 1 and having the channel to which said mold branched in it.

[Claim 4] The system according to claim 1 further equipped with the pumping means for circulating through a liquid through said mold.

[Claim 5] The system according to claim 1 formed from the ingredient chosen from the group which said mold becomes from silicon, glass, natural cell substrate Mr. hydroxyapatite, and a polymer.

[Claim 6] The system by which it is a system according to claim 1, coating is further included on said channel, and this coating promotes adhesion and exfoliation of a cell as an intact sheet from said mold.

[Claim 7] The system according to claim 1 by which said channel is formed in U mold cross section.

[Claim 8] It is an approach for producing mold equipped with a support front face. This support front face Are suitable for the adhesion and culture of a cell which have the channel of a two-dimensional pattern on it, and form a lumen within this channel. And are suitable for the adhesion and culture of one or more of a cell type in the field on the front face surrounding this channel. And this approach is the following. : From the group which consists of (a) silicon, a metal, a polymer, and natural cell substrate Mr. hydroxyapatite Process which chooses the ingredient for forming this support front face The channel of the front face of (b) this ingredient is patternized. In the process and row which produce the lumen by which seeding may be carried out in a cell, and form the tubular structure for a fluid style How to include the process which forms this mold so that seeding of the (c) cell may be carried out within this mold and the layer of the thin tissue of a number cell can be formed by the thickness surrounding this tubular structure.

[Claim 9] The approach according to claim 8 to which said patternizing is carried out according to the process chosen from the group which consists of micro processing, lithography, etching, or shaping.

[Claim 10] The following [ it is an approach for forming complex tissue ] : Process which chooses the mold which has the channel of the compound two-dimensional pattern with which the (a) cell is formed in at least one front face by which seeding may be carried out;

(b) Process which carries out seeding of the cell and forms a blood vessel or other lumina in this channel;

(c) Process which cultivates this cell under these conditions until this cell forms tubing or a lumen;

(d) this mold top — or process; which forms the organization which does seeding of the one or more cell types into this mold, and incorporates this tubing or a lumen by this — and — The approach of including the process which takes out (e) this panniculus.

[Claim 11] The following [ it is an approach according to claim 10 ];

(f) How to include further the process which builds two or more layers of said panniculus until a desired composite construction is formed.

[Claim 12] The following [ it is an approach according to claim 11 ] : How to include the process which transplants a composite structure in (g) body, and the process which carries out anastomosis of said tubing to the lumen in other organs or organizations in the source of blood supply, or the body.

[Claim 13] The system by which it is an approach according to claim 12, the process which applies coating to said channel is further included, and this process promotes adhesion and exfoliation of a cell as an intact sheet from said mold.

[Claim 14]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-542883

(P2002-542883A)

(43) 公表日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)	
A 6 1 F	2/02	A 6 1 F	2/02	4 B 0 2 9
	2/04		2/04	4 B 0 6 5
	2/06		2/06	4 C 0 9 7
	2/28		2/28	
A 6 1 M	1/10	C 1 2 M	3/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願2000-614923 (P2000-614923)  
 (86) (22) 出願日 平成12年4月28日 (2000. 4. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月30日 (2001. 10. 30)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 1 4 0 7  
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 6 0 3 6  
 (87) 国際公開日 平成12年11月9日 (2000. 11. 9)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 3 1 , 9 3 0  
 (32) 優先日 平成11年4月30日 (1999. 4. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 6 5 , 3 2 9  
 (32) 優先日 平成11年11月12日 (1999. 11. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 マサチューセッツ ジェネラル ホスピタル  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02114-2696, ボストン, フルード  
 ストリート 55  
 (72) 発明者 ヴァカンティ, ジョセフ ビー,  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 01890, ウィンチェスター, ウッドサ  
 イド ロード 14  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微細加工した2次元鋳型を用いる血管新生組織の加工

## (57) 【要約】

微細加工鋳型で血管新生組織を作成する方法および材料。表面内でエッチングされた分岐した構造を有する2次元表面を作成する。このパターンは、大きいチャネルで開始し、細いチャネルの多数のアレイに連続的に分岐し、太いチャネルに合流する。エッチング表面は、テンプレートとして働く。血管細胞を鋳型に播種し、この鋳型中のエッチングパターンに基づいて血管チャネルを形成する。一旦、母体により形成、維持されれば、鋳型の頂部を取り外す。器官または組織特異的細胞を、エッチング表面で増殖して組織の薄い血管新生シートを形成する。次いで、この組織は、鋳型から穏やかに剥離され得る。次いでこの組織は、機能的に折り畳まれ、そして3次元構造に圧縮され得る。次いでこの構造は、動物または患者に移植され得る。酸素化血液の還流が生じ、生存塊全体の生存および機能を可能にする。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 薄い組織層を作製するためのシステムであって、以下：

(a) 支持表面を備える鋳型であって、その上に2次元パターンのチャンネルを有し、該チャンネル内に管腔を形成するための細胞の付着および培養に適切であり、かつ数細胞の薄い層を形成するための該チャンネルを囲む該表面上の領域中の1つ以上の細胞型の付着および培養に適切である、0.1ミクロンの分離度を有し、該厚さは、該鋳型から取り外され得、そして積層化組織構造を形成するのに用いられ得る厚さである、鋳型、を備える、システム。

**【請求項2】** 請求項1に記載のシステムであって、以下

(b) 前記鋳型に対して付着する細胞の培養のための、該鋳型を通じた培養液の循環のための連結および手段、を備える、システム。

**【請求項3】** 請求項1に記載のシステムであって、前記鋳型がその中に分岐したチャンネルを有し、該チャンネルは、1つ以上の入口から始まり、さらなるチャンネル内を伸展し、次いで1つ以上の出口内に合流してくる、システム。

**【請求項4】** 前記鋳型を通じて液体を循環するためのポンピング手段をさらに備える、請求項1に記載のシステム。

**【請求項5】** 前記鋳型が、シリコン、ガラス、天然細胞基質様ヒドロキシアパタイトおよびポリマーからなる群より選択される材料から形成される、請求項1に記載のシステム。

**【請求項6】** 請求項1に記載のシステムであって、前記チャンネル上にコーティングをさらに包含し、該コーティングが前記鋳型からのインタクトなシートとして細胞の付着および剥離を促進する、システム。

**【請求項7】** 前記チャンネルがU型断面で形成されている、請求項1に記載のシステム。

**【請求項8】** 支持表面を備える鋳型を作製するための方法であって、該支持表面は、その上に2次元パターンのチャンネルを有し、該チャンネル内で管腔を形成する細胞の付着および培養に適切であり、かつ該チャンネルを囲む表面上の領域

中の1つ以上の細胞型の付着および培養に適切であり、そして該方法は以下：

(a) シリコン、金属、ポリマーおよび天然細胞基質様ヒドロキシアパタイトからなる群より、該支持表面を形成するための材料を選択する工程、

(b) 該材料の表面のチャンネルをパターン化して、細胞を播種され得る管腔を作製して流体流のための管状構造を形成する工程、ならびに

(c) 細胞が該鑄型内で播種され、該管状構造を囲む厚さで数細胞の薄い組織の層を形成し得るように、該鑄型を形成する工程、  
を包含する方法。

【請求項9】 前記パターン化が、微細加工、リソグラフィー、エッチングまたは成形からなる群より選択されるプロセスにより行われる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 複合組織を形成するための方法であって、以下：

(a) 細胞が播種され得る少なくとも1つの表面内に形成される、複合2次元パターンのチャンネルを有する鑄型を選択する工程；

(b) 該チャンネル内に細胞を播種して血管または他の管腔を形成する工程；

(c) 該細胞が管または管腔を形成するまで、該条件下で該細胞を培養する工程；

(d) 該鑄型上にまたは該鑄型内に1つ以上の細胞型を播種し、これにより該管または管腔を取り込む組織を形成する工程；ならびに

(e) 該組織層を取り出す工程、  
を包含する、方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法であって、以下：

(f) 所望の複合構造が形成されるまで、前記組織層の複数の層を構築する工程、をさらに包含する、方法。

【請求項12】 請求項11に記載の方法であって、以下：

(g) 身体内に複合構造物を移植する工程、および前記管を血液供給源あるいは身体内の他の器官または組織における管腔と吻合する工程、を包含する、方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法であって、前記チャンネルに対して

コーティングを適用する工程をさらに包含し、この工程が前記鑄型からのインタクトなシートとして細胞の付着および剥離を促進する、システム。

【請求項14】 単離された複合構造であって、数細胞の厚さの複数の層の組織、ならびに細胞で裏打ちされた各層内の管または管腔を含み、該構造は、以下：

(a) 細胞が播種され得る少なくとも1つの表面に形成された複合2次元パターンのチャンネルを有する鑄型を選択する工程；

(b) 該チャンネルに細胞を播種し、血管または他の管腔を形成する工程；

(c) 該細胞が管または管腔を形成するまで、該条件下で該細胞を培養する工程；

(d) 該鑄型上にまたは該鑄型内に他の細胞型を播種し、これにより該管または管腔を取り込む組織を形成する工程；ならびに

(e) 該組織層を取り出す工程、  
によって獲得可能である、構造。

【請求項15】 前記脈管系が内皮細胞を含む、請求項14に記載の構造。

【請求項16】 前記他の細胞が、実質性細胞、軟骨または骨を形成する細胞、筋細胞、および神経細胞からなる群より選択される、請求項15に記載の構造。

【請求項17】 前記実質性細胞が、心臓、肝臓、脾臓、腸、脳、腎臓、生殖組織、および肺からなる群より選択される器官から誘導される、請求項16に記載の構造。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の背景)

本発明は、一般的に、器官移植および再構築手術の分野、ならびに組織工学の新規な分野に関する。これは、より詳細には、血管供給に必要な組織、ならびに神経供給、排液系およびリンパ系のような他の複雑な構成要素を作製するための新規な方法および材料である。

## 【0002】

現在実行されているように、器官移植は、生命維持に重要な器官（心臓、肝臓、肺、腎臓および腸を含む）を破壊する疾患に罹患する患者に対する、主要な救命治療法になっている。しかし、移植に必要とされる器官の不足は、危急であり、悪くなり続けている。同様に、再構築手術のそれぞれの主要な分野が、組織不足という同じ障壁に達している。整形外科、血管外科、心臓外科、一般外科、神経外科、およびそれ以外のものはすべて、この基礎的な問題を共有する。従って、無数の患者が結果として苦しんでいる。

## 【0003】

最近の12年間に渡って、組織工学の新規な分野が、この必要を満たすために生まれた。この分野は、移植および手術的再構築のための新規な組織を作製するという問題を解決するために、医師、生命科学者およびエンジニアの専門的意見を集める。この問題に対する最初のアプローチは、1980年代に記載された。YannasおよびBurke (Bellら、Science 221, 1052 (1981) ; Burkeら、Ann Surg 194, 413 (1981) ) (皮膚のような組織の誘導された再生を促進するために、細胞を播種される改変コラーゲンのような非生存材料を移植することによって、インビボで新しい組織を作製するための方法を記載する)。VacantiおよびLanger (LangerおよびVacanti Science 260, 920 (1993) ; Vacantiら、Materials Research Society 252, 367 (1992) ) は、組織特異的細胞がインビトロで加えられる合成繊維マトリクスを記載した。このマトリクスは、非常に多孔性であり、イ



ンビトロおよび移植後にインビボで、細胞に対する質量移動を可能にする。移植後、新しい血管が、新しい血管新生化組織を作製するためにデバイスに成長する。しかし、血管形成についての比較的長期の課程は、新規に形成される組織の大きさを制限する。

#### 【0004】

組織工学の分野は、現在成熟しており、爆発的な成長を起こしている。例えば、VacantiおよびLanger、Lancet 354、32 (1999) ; LangerおよびVacanti Science 260、920 (1993) ; Rennie, J. 編、Special report : The promise of tissue engineering. Scientific American 280、37 (1999) ; およびLysaghtら、Tissue Eng 4、231 (1998) を参照のこと。実質的に全ての身体の組織および器官が研究されている。多くの組織工学技術は、ヒト用途のために利用可能になっている。Lysaghtら、Tissue Eng 4、231 (1998) ; Bellら、Science 221、1052 (1981) ; Burkeら、Ann Surg 194、413 (1981) ; Comptonら、Laboratory Investigation 60、600 (1989) ; Parenteauら、Journal of Cellular Biochemistry 45、24 (1991) ; Parenteauら、Biotechnology and Bioengineering 52、3 (1996) ; Purdueら、J. Burn Care Rehab 18、52 (1997) ; HansbroughおよびFranco、Clinical Plastic Surg 25、407 (1998) ; Vacantiら、Materials Research Society 252、367 (1992) を参照のこと。

#### 【0005】

長い間、新しい生存組織を操作するためのいくつかの技術が研究されている。この技術には、創傷修復および再生を刺激する増殖因子の使用、新たな組織発生を誘導するための非生存マトリクスを使用する誘導された組織再生技術、細胞移

植、およびマトリクス上での細胞移植が挙げられる。より最近では、幹細胞生物学における新たな理解によって、組織工学アプローチにおける使用のための始原細胞、幹細胞、または胚性幹細胞の集団の研究に導かれた。

#### 【0006】

現在までに、組織工学における全てのアプローチは、永久的な血管新生化を達成するために、組織操作されたデバイスへの血管の内方成長に依存している。この戦略は、多くの組織について十分機能している。しかし、これは、肝臓、腎臓、および心臓を含む、大きな生命維持に重要な器官のような薄く複雑な組織については足りない。整列したアレイのチャンネルを達成するための3次元印刷技術を使用する技術は、この問題を解決し始めることが記載されている。例えば、Griffithら、Ann NY Acad Sci 831、382 (1997) ; LangerおよびVacanti JP Sci Am 280、62 (1999) を参照のこと。

#### 【0007】

これらの進歩に平行して、急激に出現する分野であるMicroElectroMechanical Systems (MEMS) は、幅広いアレイの用途、自動車、慣性誘導およびナビゲーション、微小光学、化学的および生物学的センシング、およびごく最近の生物医学工学のような多様な領域において浸透している。LangerおよびVacanti Sci Am 280、62 (1999) ; McWhorterら、「Micromachining and Trends for the Twenty-First Century」、Handbook of Microlithography、Micromachining and Microfabrication、P. Rai-Choudhury編 (Bellingham, WA: SPIE Press、1997)。MEMSに対する微細加工法は、集積回路 (IC) 工業について本来開発された半導体ウエハプロセス技術の拡大を表す。サブミクロンレベルに至るまでの特徴の制御は、電気回路素子のICプロセッシングにおいて慣用的に達成され；MEMS技術は、このレベルの制御を1ミクロン未満から1cmより大きく広がる長さのスケールで機械的構造に変換する。標準的なバルク微細加工によって、

任意の形状のパターンが、一連の減算的エッチング方法を使用してウェハに刻まれ得る。3次元構造は、正確な整列技術を使用する、これらのプロセス工程の重ね合わせによって実現され得る。いくつかのグループ（Kourepennisら、「Performance of MEMS Inertial Sensors」、Proc. ALAA GN&C Conference、Boston、MA、1998；Griffithsら、Annals of Biomed. Eng. 26（1998）；Folchら、Biotechnology Progress、14、388（1998））は、これらの高度に正確なシリコンアレイを使用して、細胞挙動を制御し、遺伝子発現および細胞表面相互作用を研究した。しかし、このアプローチは、基本的に2次元技術であり、厚い、3次元組織の作製に適合され得ることは明らかではなかった。

#### 【0008】

Massachusetts Institute of TechnologyによるPCT US96/09344は、3次元印刷プロセス、固体を含まない形態の加工の形態を記載し、これは、一連の層として三次元物体を構築する。このプロセスは、その形状がコンピュータ支援設計および加工によって指示されるポリマー結合剤によって結び付けられる層におけるポリマー粉末を使用する。この技術によって、脈管供給源をまねるチャネルの分岐アレイを包含し得る規定された内部構造を可能にする。しかし、この技術は、特定のポリマーの特徴および化学によって限定される。また、これは、加工されるべき組織型を非常に限定する。ポリマー壁は、肺の肺胞毛細管壁に必要とされる血漿交換を可能にしない。

#### 【0009】

本発明の目的は、器官および組織置換のための複雑な生存した血管新生化組織、特に肝組織のような複雑そして／または厚い構造を作製するための方法および材料を提供することである。

#### 【0010】

（発明の要旨）

2次元の微細加工した鋳型から、3次元の血管新生化した複合生存組織を作製

するための方法および材料を、開発した。この方法は、表面にエッジングされた分岐構造を有する、2次元表面を作製する工程を包含する。このパターンは、個々の毛細管程度の大きさの大きなチャンネルのアレイに連続的に分岐する1以上の大きなチャンネルから開始し、次いで1以上の大きなチャンネルに合流する。エッジ表面は、エッジ表面で形成される鋳型内のテンプレートとして、個々の組織または器官の循環ために役立つ。次いで、生存血管細胞を、鋳型上で播種し、これにより鋳型内のエッジングされたパターンに基づく生存血管チャンネルを形成する。一旦、それ自体のマトリクスによって形成されそして維持されると、鋳型の頂部が取り除かれる。次いで、この器官または組織特異的細胞は、このエッジ表面に添加され、この細胞は、組織の薄い血管新生化したシートを形成するように結合および増殖する。次いで、この組織は、流量のような技術を使用して鋳型から、必要な場合、他の支持材料から穏やかに剥離され得る。次いで、この組織は、体系的に折り畳まれ、そして3次元の血管新生化した構造に圧縮され得る。次いで、この構造は、デバイスに流れ込みそしてこのデバイスから流れ出すように血管と直接接続することによって、動物または植物に移植され得る。酸素付加した血液の速効性の灌流が発生し、これにより全生物（生塊）の生存および機能を可能にする。

#### 【0011】

分岐チャンネルの設計は、2次元の分岐のアレイにコンピュータによって変換され得るフラクタル数学のような、複数の手段によって構築され、次いでウエハ上にエッジングされ得る。また、コンピュータは、生存または保存した器官または組織の試料から、3次元の血管チャンネルをモデル化し、2次元のパターンに変換し、次いで3次元の血管新生化した生存構造への再変換に役立つ。このモデルを作製するための技術は、コンピュータチップの加工のための技術およびマイクロ加工技術を含む。他の技術としては、レーザ技術が挙げられる。この鋳型の2次元表面はまた、折り畳みプロセスおよび圧縮プロセスにおいて促進するために変化され得る。例えば、この表面は、アコーディオンのように折り畳むために平面から変化され得る。これは、複数の合流プレートに積み重ねられ得る。これは、曲線であり得るか、または複数の突出部を有する。

## 【0012】

異なるタイプの組織、または同じタイプの組織の複数の層は、折り畳まれそして圧縮する前に互いに隣接して配置され得、より複雑または大きな構造を形成する。例えば、チューブシステムは、血管システム上に層状にされ得、腎臓の糸球体組織および集合管に加工する。胆管チューブは、血管新生化した生存または肝細胞組織上に層状にされ得、胆管ドレナージシステムを形成する。肺胞または気道組織は、肺毛細管上に配置され得、新しい肺組織を形成する。神経またはリンパ管は、これらと同じ一般的な技術を使用して加えられ得る。この鋳型の2次元表面は、折り畳みプロセスおよび圧縮プロセスを促進するために変化され得る。例えば、この表面は、アコーディオンのように折り畳むために平面から変化され得る。これは、複数の合流プレートに積み重ねられ得る。これは、曲線であり得るか、または複数の突出部を有する。

## 【0013】

これらの方法を使用して加工し得る組織および器官の例は、心臓、肝臓、肺、腎臓および腸のような現在移植される器官が挙げられるが、これらに限定されない。筋肉、骨および乳房組織のような他の組織もまた、作製され得る。

## 【0014】

(発明の詳細な説明)

先行技術の困難に起因して、移植の前に建設される構造のための完全な脈管システムを提供するためのアプローチは、分岐したチャネルの整列したアレイを、シリコンまたは生体適合性ポリマーのような材料から形成された基板に提供するために（これが次に細胞を播種される）、三次元プリンティングのような微細加工技術を使用して開発された。完全な分岐脈管循環は、微細加工を使用して、シリコンの表面上で二次元に作製される。次いで、この脈管循環は、シリコン鋳型から剥離され、そしてコンパクトな三次元構造に折り畳まれるかまたは丸められる。

## 【0015】

微細加工技術は、例えば、Kaneら、*Biomaterials* 20、2363（1999）により記載されるように、細胞膜—表面界面において生じる

複雑な生物学的シグナル伝達事象を理解するための、細胞および発達生物学における重要な研究において、使用されてきた。これはまた、Griffithら、Annals of Biomed. Eng.、26 (1998) により記載されるように、細胞挙動および組織の小単位の形成を案内するための、組織工学においても使用されてきた。実施例1により実証されるように、広い範囲のスケールにわたる首尾一貫した構造が、ここで作製され、このことは、複雑および／または厚い構造（例えば、肝臓）の構成のための組織工学のための本方法の効力を実証する。この実施例において構築されるデバイスは、500ミクロンの直径を有する単一の入口チャンネルで始まり、構造的スケールの法則（各連続した世代についてチャンネル幅を半分にする）に従って4つの世代を通して分岐し、直径10ミクロンの毛細管チャンネルのアレイを形成し、次いで単一の流出静脈へと合流する、チャンネルを備える。これらのチャンネルに播種され、そして適切な養分および気体の流れを提供された、生存内皮細胞は、チャンネルを内張りし、血管を形成する。実施例2において、シリコンおよびパイレックス（登録商標）の表面に播種された細胞が、マトリックスを下に置き、そして肝性または内皮のいずれかである起源の細胞型の組織のシートを形成することが実証された。これらのシートは、表面からはがれ得、そして組織の三次元単位を形成し得る。実際は、シリコンまたはパイレックス（登録商標）のウエハが、組織の形成のための鋳型として作用した。

#### 【0016】

これらの実施例は、微細加工技術が、生存組織の形成の必要性に合致するよう適合され得ることを実証する。この技術の能力は、過剰に極端に小さな距離を形成するその制御にある。その分離度は、点から点が0.1ミクロンのオーダーである。この正確さのレベルは、新たな組織形成の設計および案内の能力における、新たなレベルの制御を追加する。例えば、表面が、サブミクロンの溝またはスカラップにより刻印付けされ得、そして角部が、この同じレベルのサブミクロンの正確さで、丸くされるか、角度をつけられるかまたは鋭利にされ得る。このスケールでの構造制御は、Den Braberら、J. Biomed. Mater. Res. 40、291 (1998) により記載されるように、接触ガイドン

スのような機構を通しての細胞接着に、強力な衝撃を与え得る。この技術は、設計がシリコンウエハの表面に限定されていたことに起因して非常に薄い構造に制限されていた先行技術に関する問題を、克服する。ウエハを一次的な鋳型として使用し、次いで組織をそこから剥離させ、そしてこの組織を三次元形状に折り畳むことにより、この制限を克服する。

#### 【0017】

本明細書中に記載されるように、複雑な組織は、薄い血管新生化組織の層を積層させてより厚い組織構造またはより複雑な器官等価物を形成することにより、形成される。この薄い血管新生化組織層は、以下により形成される：

- (1) 内部に細胞が播種され得る、少なくとも1つの表面に形成されたチャネルの複雑なパターンを有する鋳型を設計する工程；
- (2) 脈管（内皮）細胞をこのチャネル内に播種する工程；
- (3) この脈管細胞を、これらが脈管構造を形成するまでの条件下で培養する工程；
- (4) 他の型の細胞を、この鋳型の上または内部に播種する工程であって、その結果、脈管構造を組み込んだ組織が形成される、工程；
- (5) 血管新生化組織層を除去する工程；ならびに
- (6) 所望の複雑な構造（または器官等価物）が形成されるまで、血管新生化組織層の複数の層を組み立てる工程。

#### 【0018】

次いで、この構造が移植され得、そしてこの脈管構造は、適切に設計される場合には、既存の脈管構造内に吻合されて、移植された器官等価物のための即時の血液供給を提供し得る。

#### 【0019】

（薄い血管新生化組織層を作製するための鋳型）

（鋳型を形成するための材料）

ウエハ鋳型の加工は、適切な基板の選択により開始する。種々の材料のうちのいずれかを使用して、表面を形成し得、この表面の上に、分岐した構造が成形またはエッチングされ得る。これらには、シリコンのような「不活性」材料、ポ

リエチレンビニルアセテート、ポリカーボネート、およびポリプロピレンのようなポリマー、ならびにセラミックのような材料またはヒドロキシアパタイトのような材料が含まれる。特に、鋳型は、金属、セラミック、半導体、有機物、ポリマー、および複合材料から構築され得る。代表的な金属および半導体としては、薬学的等級のステンレス鋼、金、チタン、ニッケル、鉄、金、スズ、クロム、銅、これらまたは他の金属の合金、ケイ素、二酸化ケイ素が挙げられる。

#### 【0020】

代表的に、微細加工は、50ミリメートルと300ミリメートルとの間の範囲の直径、および200ミクロンと1200ミクロンとの間の範囲の厚さの、標準的な嵩のある単結晶シリコンウエハ上で実施される。これらのウエハは、標準的な半導体材料の多数の販売源から入手可能であり得、そして切断および研磨されて正確な寸法、均一な結晶学的配向、および高度にポリッシュされた、光学的に平坦な表面を提供する。パイレックス（登録商標）ボロシリケートまたは他のガラスから作製されたウエハもまた生成され得、そして各ガラス性材料に対して使用される代替的なプロセスを用いて、微細加工プロセスに挿入され得る。

#### 【0021】

基板材料の選択は、多くの考慮（所望の鋳型寸法による加工プロセスに存在する要件、最終テンプレートの所望の大きさ、ならびにウエハの表面特性およびこれらの種々の細胞型、細胞外マトリックス（「ECM」）およびポリマー骨格との相互作用が挙げられる）により案内される。費用もまた、組織鋳型の全体の大きさの要件に依存して、考慮され得る。

#### 【0022】

他に指定しない限り、用語「ポリマー」は、重合または接着して単一の単位を形成し得る、ポリマーおよびモノマーを含む。ポリマーは、代表的に加水分解または酵素的切断により、非生分解性または生分解性であり得るが、生分解性マトリックスは、代表的には好ましくない。なぜなら、鋳型は移植されず、そして好ましくは再使用可能であるからである。同様に使用され得る非ポリマー性材料としては、有機材料および無機材料が挙げられ、例えば、ヒドロキシアパタイト、炭酸カルシウムであり、これらは、溶媒よりむしろ接着剤の適用により、凝固す



る。好ましい実施形態において、ポリマーは、そのポリマーが細胞からの適切な生物学的応答（例えば、付着、移動、増殖および遺伝子発現）を惹起する能力に基づいて選択される。上記のように、現在細胞培養において使用されている多くの非生分解性プラスチック（これには、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニルアセテートが挙げられる）、ならびに生分解性ポリマー（例えば、ポリヒドロキシ酸およびポリヒドロキシアルカノエート）が、公知である。光重合可能な生体適合性の水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコールテトラアクリレート（Ms 18, 500）が挙げられ、これは、アルゴンレーザーを用いて、生物学的に適合性の条件下で、トリエタノールアミン、N-ビニルピロリドン、およびエオシンYのような開始剤を使用して、光重合され得る。他の適切なポリマーは、The Polymer Handbook、第3版（Wiley, N. Y.、1989）を参照して得られ得る。

#### 【0023】

大半の熱可塑性ポリマーに対する溶媒（例えば、塩化メチレンまたは他の有機溶媒）が公知である。タンパク質および多糖類ポリマーに対する、有機溶媒および水性溶媒もまた公知である。結合剤は、従来の粉末プロセス方法において使用される材料と同じであり得るか、または加熱、光重合または触媒の結果として生じる化学的変化または物理的変化を通じて、同じ結合剤を究極的に得るように設計され得る。

#### 【0024】

これらは、細胞接着を増強する材料でコーティングされ得る。いくつかの実施形態において、ポリマーへの細胞の付着は、化合物（例えば、基底膜成分、寒天、アガロース、ゼラチン、アラビアゴム、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲンおよびV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、それらの混合物）ならびに細胞培養の分野の当業者に公知の他の材料を用いて基板をコーティングすることによって増強される。

#### 【0025】

鋳型表面の性質はまた、間隙率、細胞付着（例えば、表面変化または構造を変

化させることによって）、可撓性または剛性（組織構築物の除去を容易にするために望ましいものであり得る）を変化させる鋳型材料上またはその材料内の材料の封入を介して操作され得る。

#### 【0026】

（鋳型表面の設計のための方法）

一旦、基板材料が選択されると、鋳型生成のためのプロセス配列を規定しなければならない。鋳型のジオメトリ（特に、必要とされる異なる特徴の深さの数）は、特定のプロセス配列を決定する主要な因子である。最も単純な場合は、鋳型の単一の深さ寸法の場合である。特に、シリコン基板について、プロセス配列（図1aに示される）は、以下の通りである：第一に、シリコンウェハを清掃し、そして感光性材料の層を表面に適用する。代表的には、この層を、高い回転速度でスピンし、均一の厚さのコーティングを得る。フォトレジストを裏打ちし、次いでウェハを紫外線または半透明マスクを介した他の短波長光に曝露する。この段階は、所望の画像分離度に依存して、いくつかのマスキング技術のうちのいずれかを使用して果たされ得る。次いで、このレジストを、適切な現像化学反応において現像し、次いでウェハを堅焼きして、レジストから過剰な溶媒を除去する。一旦、リソグラフィープロセスが完了すると、ウェハを、いくつかの可能性のある化学反応のうちの1つを使用して、プラズマリアクタ中でエッチングし得る。エッチングは、2次元パターンを3次元に移すために役立つ：ウェハへの規定された深さ。プラズマパラメータは、得られたトレンチ（半円形、垂直壁（straight-walled）プロフィール、角をなす側壁）の所望の形状、ならびにマスキングフォトレジストに渡るシリコンに対する腐食液の選択性によって決定される。一旦、エッチングが完了すると、フォトレジストが除去され得、そしてウェハが、組織成形プロセスにおける使用のために調製され得る。

#### 【0027】

ガラスおよびポリマーウェハ鋳型を、類似の配列を使用して加工し得るが、実際のプロセスは、介在マスキング層の付加によって改変され得る。なぜなら、これらの材料に対する腐食液が、同様にフォトレジストを攻撃するからである。このような介在材料は、単に、フォトレジストから中間層、次いで、その下のウェ

ハ上にパターンを移すように機能する。いくつかの湿式化学反応 (wet chemistry) のうちの1つにおいてエッチングされたシリコンにとって、介在層はまた必要であり得る。

#### 【0028】

ウェハ鋳型のジオメトリにおける増大した可撓性は、図1bに示されるように、マスキングおよびエッチングのさらなるサイクルを挿入することによって得られ得る。ここで、マスキング層が適用される第二の工程およびエッチングされた開放領域が示される。この変更は、変化する深さのチャネルをウェハ鋳型に機械加工する機会を提供する。異なる直径を有する脈管分岐について、この増大した可撓性は、非常に重要になる。この技術は所望されるように、多くのさらなる層および異なる深さとして提供されるように拡張され得る。

#### 【0029】

鋳型表面は、所望の脈管構造または他の管状構造を有する組織切片を作製するために必要とされるように形成される。天然に存在する構造を模倣する場合、チャネルは、天然の組織において生じるパターンと同じ2次元パターンにおいてエッチングされる。差異は、天然の組織が、2次元構造に限定されないが、代わりに、3次元的に伸長する脈管構造を含むことである。これは、本明細書中に記載されるように作製される薄い組織切片または器官切片とは異なる。

#### 【0030】

分岐チャネルの設計は、多くの手段（例えば、コンピュータによって分岐の2次元アレイに変換され得、次いでウェハ上にエッチングされ得るフラクタル数学によって構築され得る。また、コンピュータは、生きた器官標本または組織標本、あるいは保存された器官標本または組織標本から3次元脈管チャネルをモデリングし得、2次元パターンに変換し得、次いで3次元の生きた血管化構造への再変換を助け得る。CAD-CAM型ソフトウェアプログラムは、代表的には、これらの構造の設計に最も有用である。

#### 【0031】

(鋳型形成のための方法)

支持体として使用される材料の選択は、鋳型表面が形成されて、分岐構造を形

成する理由を決定する。材料は、成形（特に、ポリマーの場合）、レーザーのような技術を用いたエッチング、プラズマエッチングまたは化学的エッチング、フォトリソグラフィー、あるいは固体を含まない形態の技術（3次元プリンティング（3DP）、ステレオリソグラフィー（SLA）、選択的レーザー焼結（SLS）、弾道粒子製造（BPM）および融合堆積（deposition）モデリング（FDM）、マイクロ機械加工（micromachining）もしくはそれらの組み合わせを含む）によって形成され得る。

#### 【0032】

（従来のポリマープロセッシング）

ポリマーを、標準的な技術（例えば、溶媒キャストリングまたは加工前鑄型への押し出し成形）を使用して成形され得るか、固体を含まない形態の技術のうちの1つを使用して形成され得るか、あるいは、成形後に、化学的エッチング、マイクロ機械加工、レーザーまたは本明細書中で記載される他の方法を使用して形成され得る。これらの方法がまた使用されて、ポリマー以外の材料から鑄型を形成し得る。

#### 【0033】

（シリコン材料のマイクロ機械加工および化学的プロセッシング）

一つの実施形態において、鑄型デバイスは、シリコン、金属、ポリマーおよび他の材料における小さな機械構造の作製による微細加工プロセスによって作製される。これらの微細加工プロセスは、集積回路および他の超小型電子デバイスを作製するために使用される非常に確立された方法（マイクロ機械加工の分野の研究者によって開発されたさらなる方法によって増大する）に基づく。

#### 【0034】

本明細書中で議論される鑄型を作製する際に使用され得る微細加工プロセスとしては；リソグラフィー；エッチング技術（例えば、湿式化学（wet chemical）、乾式（dry）、およびフォトレジスト除去）；シリコンの温度酸化；電気めっきおよび無電解めっき；拡散プロセス（例えば、ホウ素、リン、ヒ素、およびアンチモン拡散）；イオン注入；フィルム蒸着（例えば、蒸発（フィラメント、電子ビーム、フラッシュ、ならびにシャドウイング（shadow

ing) および工程視野 (step coverage) )、スパッター、化学蒸着法 (CVD)、エピタクシー (蒸気相、液相、および分子線)、電気めっき、スクリーン印刷およびラミネーションが挙げられる。例えば、一般的に、Jaeger. Introduction to Microelectric Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA 1988); Runyanら、Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987~1998; Rai-Choudhury、編、Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, WA 1997) を参照のこと。以下の方法が、鋳型を作製するために好ましい。

#### 【0035】

水性フッ化水素酸中のシリコンの電解陽極酸化 (anodization) は、潜在的に光と組み合わせて、そのシリコン内へチャネルをエッチングするために使用され得る。エッチングされるべきシリコンウエハのドーピング濃度を変動させることによって、エッチングの間の電解質電位、入射光強度および電解質濃度の制御が、最終的な細孔構造上で達成され得る。

#### 【0036】

本プロセスは、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以上のオーダーの直径を有する鋳型を作製するために、シリコンのディーププラズマエッチング (deep plasma etching) 使用する。針を、電圧を間接的に制御すること (電気化学的エッチングにおけるように) よりもむしろ、写真平版を使用して直接かたどり、従って、最終的な鋳型外形に渡ってより大きな制御を提供する。

#### 【0037】

本プロセスにおいて、適切なマスキング材料（例えば、金属）は、シリコンウエハ基板上に蒸着され、そして所望の鋳型の直径を有するドットにかたどられる。ついでこのウエハを、フッ素化合物／酸素化合物ベースの慎重に制御されたプラズマに供して、非常に深く、大きな縦横比のトレンチ（trench）をシリコン内にエッチングする。例えば、Jansenら、「The Black Silicon Method IV: The Fabrication of Three-Dimensional Structures in Silicon with High Aspect Ratios for Scanning Probe Microscopy and Other Applications」IEEE Proceedings of Micro Electro Mechanical Systems Conference、88～93頁（1995）を参照のこと。

#### 【0038】

本プロセスにおいて、最初に金属層をプレーナー基板上でエバポレートする。次いで、フォトレジストの層を、針の形状において露出した金属領域を残す、かたどられらた鋳型を形成するように、金属上に蒸着する。金属シード層の露出した領域上に電気めっきすることによって、フォトレジストによって境界をつけられた鋳型が、電気めっきされた材料で充填され得る。最終的に、この基板およびフォトレジスト鋳型を除去し、仕上げられた鋳型アレイが残る。本プロセスによって作製された鋳型は、一般的に $1\mu\text{m}$ 以上のオーダーの直径を有する。例えば、Frazierら、「Two dimensional metallic microelectrode arrays for extracellular stimulation and recording of neurons」、IEEE Proceedings of the Micro Electro Mechanical Systems Conference、195～200頁（1993）を参照のこと。

#### 【0039】

シリコンまたは他の材料からできた鋳型を形成するための別の方法は、鋳型型枠を作製するために微細加工技術を使用することであり、標準的な鋳型転移技術

(例えば、エンボス加工または射出成形)を使用してその鋳型型枠を他の材料に移し、そして最終的な鋳型を得るために、新たに作製された鋳型を使用して最初の鋳型型枠の形状を再生する。あるいは、その鋳型型枠の作製がスキップされ得、そしてその鋳型は、直接、微細加工され得、次いでこれは最終的な鋳型を作製するために使用され得る。

#### 【0040】

固体シリコン鋳型を形成する別の方法は、その産物について *Containerless Research, Inc* (Evanston, Illinois, USA) により利用されるように、シリコン基板上でエピタキシャル (epitaxial) 増殖を使用することによるものである。

#### 【0041】

エッチングされた多孔性構造のサイズ分布は、Lehmann, 「*Porous Silicon—A New Material for MEMS*」、*IEEE Proceedings of the Micro Electro Mechanical System Conference*, 1~6頁 (1996) に詳細に記載されるような、ドーピング類およびイルミネーション条件を含む、いくつかの変数にかなり依存する。例えば、多孔性ポリマー鋳型は、そのポリマー内に分散される揮発材料または浸出材料 (例えば、揮発性の塩) を含むポリマーを微小成形し、次いでその分散材料を揮発させるか、または浸出し、その鋳型の形状内に多孔性ポリマーマトリックスを残すことによって形成され得る。中空鋳型は、例えば、乾式エッチングプロセス (Laermerら、「*Bosch Deep Silicon Etching; Improving Uniformity and Etch Rate for Advanced MEMS Applications*」*Micro Electro Mechanical Systems*, Orlando, FL, USA, (Jan. 17~21, 1991); Despontら、「*High-Aspect-Ratio, Ultrathick, Negative-Tone Near-UV Photoresist for MEMS*」、*Proc. of IEEE 10<sup>th</sup> Annual International Workshop o*

n MEMS、Nagoya、Japan、518～522頁（Jan. 26～30、1997））；リソグラフィー的に定義されるポリマーにおける微細鋳型作製および選択的側壁電気めっき；またはエポキシ鋳型転移を使用する直接微細成形技術の組み合わせを使用して加工され得る。

#### 【0042】

クロムマスクは、クロムで被覆された窒化シリコン層を使用して、固体鋳型に置換され得る。次いで固体鋳型をエッチングし、クロムを取り除き、そしてそのシリコンを酸化させる。窒化シリコン層は、酸化を防止する。次いで、窒化シリコンを取り除き、露出したシリコンおよび酸化被覆シリコンを他のどの場所にも残す。次いで、針を、その針の内部孔を形成するように、高度に異方性の様式においてシリコンを選択的にエッチングする、ICPプラズマに曝露する。第2の方法は、実際の針構造物が周りに蒸着される「型枠」として、固体シリコンを使用する。蒸着後、その型枠をエッチングして、中空構造物を得る。シリカ針または金属針は、異なる方法を使用して形成され得る。次いで、ウエハを制御された厚さまで酸化し、次いで、窒化シリコンを取り除き、そしてそのシリコン核を、中空シリカ鋳型を形成するように選択的にエッチングする（例えば、湿ったアルカリ性溶液において）。

#### 【0043】

別の実施形態において、深部反応性イオンエッチングが、従来の反応性イオンエッチャー（etcher）における改変された黒色シリコンプロセスと組み合わせられる。初めに、フォトレジストを通してSiO<sub>2</sub>（例えば、シリコンウエハ上に）内にデザインをかたどる。次いで、そのシリコンは、深い垂直方向の孔またはチャネルをエッチングするために、誘導結合プラズマ（ICP）リアクターにおいて、深部反応性イオンエッチング（DRIE）を使用して、エッチングされ得る。次いで、そのフォトレジストを除去する。次に、第2の写真平板工程が、残りのSiO<sub>2</sub>層をかたどる。次いで、そのフォトレジストを除去し、そしてそのシリコンウエハは、SiO<sub>2</sub>で被覆されていない領域において、そのウエハを完全に貫いて再び深部シリコンエッチングされる。このプロセスは、以下のように変更され得る。そのウエハがかたどられた後、フォトレジスト層およびS



i O<sub>2</sub>層は、等角DCスパッタークロム (conformal DC sputtered chromium) で置換される。第2のICPエッチングは、反応性イオンエッチャー (RIE) において、SF<sub>6</sub>/O<sub>2</sub>プラズマエッチングで置換され、これにより明確に傾斜した外側側壁を生じる。Henryら、「Micromachined Needles for the Transdermal Delivery of Drugs」Micro Electro Mechanical Systems, Heidelberg, Germany、494～498頁 (Jan. 26-29, 1998)。

#### 【0044】

金属形状は、上記の技術を使用してシリコンから作製され得る、固体形態上の適切な金属層の物理蒸着法によって形成され得るか、または他の標準的な鋳型技術 (エンボスまたは射出成形) を使用して形成され得る。この金属は、電解研磨技術を使用して選択的に除去され、ここで電解溶液中に適用された陰極電位は、電界線 (electric field line) の濃さに依存して金属の溶解を引き起こす。一旦、下にあるシリコン形態が、露出すると、このシリコンは、選択的にエッチングされて、構造を形成する。このプロセスはまた、金属以外の物質を針形態に沈着させ、そして上記の手順に従うことによって、他の物質から作製される構造を作製するために使用され得る。

#### 【0045】

二酸化ケイ素から形成される鋳型は、金属を沈着させ、次いで固体の針形態をエッチングして、中空二酸化ケイ素構造を残すのではなく、シリコン鋳型形態の表面を酸化させることによって、作製され得る。1つの実施形態において、長軸方向の溝、または鋳型の外表面に対する他の改変を備える、中空鋳型、多孔性鋳型または固体鋳型が、提供される。

#### 【0046】

ポリマー性鋳型が、微細製作された鋳型を使用して作製され得る。例えば、エポキシ鋳型が、上記の通りに作製され得、そして射出成形技術が、この構造を形成するために適用され得る。これらの微細成形 (micromicromolding) 技術は、本明細書中に記載される他の方法よりも繰り返すことが比較的

高価ではない。

【0047】

(鑄型を構成するための固体を含まない形態方法)

3DPは、Sachsら「CADキャスティング：Direct Fabrication of Ceramic Shells and Cores by Three Dimensional Printing」Manufacturing Review 5 (2) . 117~126 (1992) およびSachsらに対する米国特許第5, 204, 055号にによって記載されている。3DPは、粉末が連続的に沈着した層の選択された領域に結合剤 (binder) をインクジェットにより印刷することによって固体対象物を作製するために使用される。各層は、粉末のベッド (bed) の表面上に粉末の薄層を広げることによって作製される。この粉末ベッドは、粉末の広がりおよび各層の印刷の際に下降するピストンによって支持される (または、逆に、インクジェットおよびスプレッダー (spreader) は、各層およびベッドの印刷が静止したままの後に上昇される)。各層についての指示は、構成要素のコンピュータ補助設計 (CAD) の表示から直接誘導される。印刷されるべき領域は、対象物の所望の平面とCADの表示との間の交差領域を算定することによって得られる。個々の切片化されたセグメントまたは層は、三次元構造を形成するために連結される。未結合粉末は、構成要素の接続されていない部分を一時的に支持する。なぜなら、構造が構築されるが、印刷終了後に除去されるからである。

【0048】

本明細書に記載される通りにある程度利用され得る3DP以外のSFF方法は、立体 (stereo) -リソグラフィー (SLA)、選択的レーザ焼結 (SLS)、衝撃性粒子製造 (BPM)、および融合沈着 (fusion deposition) モデリング (FDM) である。SLAは、光重合性液体ポリマー物質の槽 (bath) の表面に対してベクタスキャン (vector scan) される収束した紫外線 (UV) レーザの使用に基づく。UVレーザは、槽のポリマー化を引き起こし、ここでレーザビームが槽の表面にあたり、表面におよび表面の直下に第1の固体プラスチック層の作製を生じる。次いで、固体層は、槽中

に下がり、そしてレーザで生成したポリマー化プロセスが、次の層の生成のために繰り返され、そして所望のデバイスを形成する複数の積載層が得られるまで、繰り返される。各々の場合において、最も最後に作製された層は、液体槽の表面よりもわずかに下に、次の層の作成のための位置に常に下げられる。立体リソグラフィのためのシステムが作製されており、そしてValencia, CAの3D Systems, Inc. により販売されている（これは、生体適合性ポリマー物質での使用のために容易に適合する）。SLSはまた、収束したレーザビームを、ゆるく詰まったプラスチック粉末の焼結領域以外に使用する（ここで粉末は、層ごとに適用される）。この方法において、粉末の薄層は、回転機構により、平らな表面上に均一に広がる。次いで、この粉末は、高出力のレーザビームによりラスタ走査される。レーザビームにより打たれた粉末物質は、融合され、一方、粉末の他の領域は、解離したままである。全ての部分が終了するまで、粉末の連続層が、一層ずつ上に、沈着され、そしてラスタ走査される。各層は、前層に層が結合するに十分深く焼結される。医学用デバイスの作製における使用のために適用可能な適切なシステムは、Austin, TXのDTM Corporationから入手可能である。

#### 【0049】

BPMは、インクジェット印刷装置を使用する。ここで液体ポリマーまたはポリマー組成物質のインクジェット流が、インクジェットプリンターが二次元グラフィック印刷を生じる様式と同様に、コンピュータ制御下で三次元対象物を作製するために使用される。このデバイスは、粒子と連続層との間に結合を生じる、冷間溶接法または迅速な凝固（rapid solidification）技術を使用して、一層ずつ、標的に、連続する断面を印刷することによって形成される。金属または金属複合物に適用されるようなこのアプローチは、Troy, NYのAutomated Dynamic Corporationによって提案されている。FDMは、加熱または溶媒の存在下で流体にされる、ポリマー性物質から形成される押し出しフィラメントを配置するために、z動作を備えるx-yプロッターを用いる。適切なシステムは、Minneapolis, MNのStratasys, Incorporatedから入手可能である。

## 【0050】

(血管化された組織層を形成するための細胞)

血管化された組織の形成を特に参照して本明細書中に記載されているが、チャネルは、種々の異なる流体（血液だけではなく、また胆汁、リンパ、尿および他の体液も）の通過のための、ならびに他の細胞型（特に、神経細胞）の再生または増殖を導くための内腔を形成するために使用され得ることが理解されるべきである。この組織層は、血管構造を形成するためにいくつかの内腔を、および他の目的のために、または特定の目的（代表的には、組織中の細胞に、および組織中の細胞から酸素および栄養を運ぶために血液供給源を提供すること）のためにいくつかの内腔を含み得る。

## 【0051】

組織は、代表的には、1以上の型の「機能的な」細胞すなわち実質細胞（例えば、肝細胞、膵臓細胞、腎臓細胞、脳細胞、生殖組織細胞、腸形成細胞、神経細胞、骨細胞、筋肉細胞、心臓細胞、皮膚細胞などのような特定の代謝機能などを有する細胞）を含む。血管構造は、代表的には、内皮細胞から形成される。

## 【0052】

細胞は、生検によって得られ得るか、または生きているドナー、細胞培養物もしくは剖検から回収され得る。細胞は、コラゲナーゼでの消化のような標準的な技術を使用して解離され、次いで鋳型中にすぐに播種され得るか、または細胞培養物中で維持された後に播種され得る。細胞は、組織が移植されるべき患者に由来するか、または適切なドナーに由来する、正常細胞であり得るか、または遺伝子操作され得る。

## 【0053】

(鋳型内に細胞を播種する方法)

二次元微細加工された鋳型から、三次元で複雑な血管化生組織を作製するための方法および材料が開発された。この方法は、表面にエッチングした分岐構造を有する二次元表面を作製する工程を包含する。図2aに示されるように、好ましい実施形態では、シリコンウエハ11から形成される鋳型10におけるパターンは、1以上の大チャネル12で開始し、これは連続的に、個々の毛細管14a、

14b、14cなどのような小さいチャンネルの多数のアレイに分岐し、次いで、1以上の大チャンネル16に合流する。単一の「動脈」チャンネル12および「静脈」チャンネル16の断面図を、図2bに示す。「毛細管」チャンネル14a、14b、14cなどを備える鋳型10の部分の断面図を、図2cに示す。鋳型は、図2dにおいて断面図で示され、約5ミクロンの深度を有する。

#### 【0054】

エッチングされた表面を、個々の組織または器官の循環のためのエッチング表面で形成された鋳型におけるテンプレートとして供する。図4Aに示されるように、鋳型片30および32を、一緒に適合させ、囲い34を作製し、そして細胞を培養する。脈管チャンネル36からの脈管細胞は、図4Bに示されるように、鋳型にエッチングされたパターンに基づいた。一旦、形成され、そしてそれらの自己マトリクスによって維持されると、鋳型の上部32を取り外し、次いで、器官または組織特異的細胞を、このエッチングされた表面に付加する。この表面で、それらの細胞は接着し、そして増殖して、薄い血管化した組織のシート36を形成する。図4Cにおいて示されるように、次いで、この組織を、流動のような技術および必要ならば他の支持体物質を使用して、この鋳型から穏やかに剥離し得る。

#### 【0055】

(組織または器官等価物の構築)

組織層の形成後、図5に示されるように、この組織を、組織的に折り畳み得、そして三次元血管化構造に成形し得る。鋳型の二次元表面は、折り畳みおよび成形プロセスを補助するように変化され得る。例えば、表面は、平面から折り畳まれたアコーディオン (a c c o r d i a n) 様に変化され得る。これは、複数の合流プレートに積層され得る。これは、曲線をなしても、複数の投影を有していてもよい。

#### 【0056】

図3A～Gは、単一の組織層36 (図3A) が、折り畳まれ得る (図3Bおよび3C) か、もしくは堆積され得るか (図3D)、またはバルーン形状 (図3E)、漏斗 (図3F)、もしくは大管腔 (図3G) を形成するように拡張され得る

様式の透視図である。

【0057】

次いで、この構造は、図6に示されるように、デバイスの内外へ流動するように血管を直接的に接続することによって、動物または患者内に移植され得る。酸素添加血液の急速な灌流が生じ、これは、生塊（生物）全体の生存および機能を可能にする。

【0058】

異なる型の組織または複数層の同じ型の組織を、折り畳みおよび成形の前に、互いに隣接して配置して、より複雑な構造またはより大きな構造を作製し得る。例えば、尿細管系は、脈管系に積み重ねられて、腎臓の糸球体組織および集合管を加工し得る。胆管は、血管化された肝臓または肝細胞組織上に上張りされて、胆管ドレナージ系を作製し得る。肺胞または気道組織は、肺の毛細管上に配置されて、新たな肺組織を作製し得る。神経またはリンパ管は、これらの同じ一般的技術のバリエーションを使用して付加され得る。鋳型の二次元表面は、折り畳みおよび成形プロセスにおいて補助するように変動され得る。例えば、表面は、平面から折り畳まれたアコーディオン（*accordian*）様に変化され得る。これは、複数の合流プレートに積層され得る。これは、曲線をなしても、複数の投影を有していてもよい。

【0059】

（実施例1：肝臓加工のための分岐血管化チャネルを組織操作するためのテンプレートの微細加工）

微細加工技術を、シリコンおよびパイレックス（登録商標）表面において使用して、移植前に、操作された組織に統合され得る完全な脈管系を作製した。脈管の分岐構築および毛細管ネットワークを暗示するトレンチパターンを、標準的な写真平板技術を使用して、シリコンまたはパイレックス（登録商標）表面にエッチングして、テンプレートとして供した。肝細胞および内皮細胞を培養し、引き続いて、これらの二次元鋳型から、単一細胞単層として剥離した。両方の細胞型とも、これらの表面上で生存可能であり、そして増殖性であった。さらに、肝細胞は、アルブミン産生を維持した。次いで、剥離された単層を、成形された三次

元組織に折り畳んだ。目的は、これらの分岐脈管ネットワークを二次元テンプレートから剥離し、その結果、これらの分岐脈管ネットワークを、実質組織（例えば、肝細胞）の層と組合せて、移植のための生血管化組織の三次元高次構造を形成し得る。

#### 【0060】

（材料および方法）

（微細加工技術）

生血管化組織のシートの形成のためのテンプレートを、微細加工技術を利用して加工した。本研究のために、単一レベルのエッチを利用して、脈管ネットワークパターンを、シリコンおよびパイレックス（登録商標）ウエハの両方の表面における接続されたトレンチのアレイに転写した。

#### 【0061】

この表現型において、単一の幾何学を、脈管ネットワークを模造するために選択した。各ウエハの縁の付近に、 $500\mu\text{m}$ の深度で、入口または出口を位置付けた。短い長さの後、この入口および出口は、深度 $250\mu\text{m}$ の3つのより小さなチャンネルへと分岐し；これらの各々は、再度、3つの $125\mu\text{m}$ のチャンネルに分岐し、そして最終的に、3つの $50\mu\text{m}$ のチャンネルに至る。チャンネルは、 $50\mu\text{m}$ のチャンネルから伸長して、毛細管ネットワークを形成し、これは、レイアウトのバルクを含む。これらの入口と出口とのネットワークの間には、毛細管床を形成し、そして入口と出口との間の空間全体を充填するダイヤモンドおよび六角形のタイル張りのパターンが存在する。1つの高次構造では、毛細管深度は $25\mu\text{m}$ に設定され、他方では、毛細管は $10\mu\text{m}$ に固定される。この幾何学を、その単純性ならびに肝臓の分岐構築のサイズスケールに対するそのおおよその近似値を理由に選択した。このネットワークのレイアウトは、C A D E N C E ソフトウェア（Cadence、Chelmsford、Massachusetts）またはSilicon Graphics workstationを使用して達成された。このレイアウトを有するファイルを作製し、そしてAlign-Rite（Burbank、California）に電子的に送付し、ここで、レイアウト幾何学を模写する電子ビーム作製パターンを有するガラスプレート

を作製し、そして石版術処理のために返送された。

#### 【0062】

組織工学テンプレートの製造のための出発物質は、MEMS加工に適した標準的な半導体グレードのシリコンウエハ (Virginia Semiconductor, Powhatan, Virginia)、および標準的なパイレックス (登録商標) (pyrex) ウエハ (Bullen Ultrasonics, Eaton, Ohio) であった。シリコンウエハは、100mm直径および525ミクロンの厚さであり、単一結晶配向性に対してウエハは一次および二次平面の切断であった。結晶配向性は $\langle 100 \rangle$ であり、そしてウエハは、ホウ素でドーピングされ、約 $5\text{ W-cm}$ の抵抗率であった。前表面を光学仕上げに研磨し、後ろ表面をマット仕上げに研いだ。パイレックス (登録商標) ウエハはCorning 7740 (Corning Glass Works, Corning NY) に同一な組成物のウエハであり、これはまた100mmの直径であったが775ミクロンの厚さを有した。前表面および後表面の両方は、光学仕上げに研磨した。微細一致させる前に、両方のウエハ型を、1部分の $\text{H}_2\text{O}_2$ に対して1部分の $\text{H}_2\text{SO}_4$ の混合物中140℃で20分間清澄し、18MWの低効率を有する脱イオン水の中で8回リンスし、そして高熱 $\text{N}_2$ ガス流で乾燥させた。

#### 【0063】

シリコンウエハおよびパイレックス (登録商標) ウエハに関して、標準的な光リソグラフィーを溝を形成するためのエッチマスク (etch mask) として利用した。パイレックスウエハのエッチングは、エッチ化学物質を通さないパターン移動のための中間層の沈着を必要とする。パイレックス (登録商標) を超えて厚さ $0.65\text{ }\mu\text{m}$ のポリシリコンの層を、この目的のために利用した。この層は、標準的なシラン分解法を介して、570℃および500mトルで低圧化学蒸着法 (LPCVD) を使用して沈着させた。シリコンの場合、フォトレジスト単独が、利用した3つのエッチ化学物質のうちの2つに対する限定された曝露に抵抗し得た。第3の化学物質に関して、二酸化ケイ素の $1.0\text{ }\mu\text{m}$ の層が水素および酸素中1100℃で熱的に沈着された。

#### 【0064】



一旦ウエハが加工のために清澄されそして調製されると、原型分岐構造のイメージが標準的なMEMS光リソグラフィ技術を使用してウエハ表面上に変換された。フォトレジストの単層 (Shipley 1822, MicroChem Corp., Newton, Massachusetts) を4000rpmでウエハ表面上で回転させ、約2.4 $\mu$ mの厚さのフィルムを得た。90℃で30分間焼結した後、フォトレジストの層を、Karl Suss MA6 (Suss America, Waterbury, Vermont) マスクアライナー (aligner) を用いて、UV光に曝露した。光は、初めに記載されたりソグラフィックプレートを通じて通過し、これは被膜されたウエハと物理的接触であった。この方法により、0.1 $\mu$ mまでの精度でプレート上にパターンが複製される。曝露の後、ウエハをShipley 319 Developer (MicroChem Corp., Newton, Massachusetts) 中で発達させ、そして脱イオン水でリンスし、乾燥させた。最後に、ウエハを110℃で30分間焼結し、レジストを硬化し、そして80ワットの電力で42秒間酸素プラズマに曝露し、開放領域から残っているレジストを除去した。

#### 【0065】

シリコンウエハは、3つの異なる化学物質を用いてエッチングされ、一方、パイレックス (登録商標) ウエハは、1つの技術のみを用いて加工された。パイレックス (登録商標) に関して、ポリシリコン中間体層に適用されるリソグラフィパターンを、リアクティブイオンエッチングプラズマ系 (Surface Technology Systems, Newport, United Kingdom) 中、SF<sub>6</sub>への簡単な (約1分間) 曝露を使用して移動させた。フォトレジストを除去し、そしてポリシリコン層に刻印したこのパターンを、1部分のHFに対する2部分のHNO<sub>3</sub>の混合物を用いて室温で、シリコン中の溝に移動させた。1分当たり1.7ミクロンのエッチング率を使用して、20ミクロンの深さの溝を約12分間でパイレックス (登録商標) ウエハにエッチングした。化学物質が等方性なので、溝がエッチングされる場合、それらは広くなる。25 $\mu$ m幅の毛細管溝を用いた配置パターンでの加工は流路の融合を生じる傾向があったが、10 $\mu$ m幅の溝の使用によって、この現象を避けた。エッチング後の流

路の干渉分析は、表面粗度が $0.25\mu\text{m}$ 未満であったことを示した。一旦パイレックス（登録商標）ウェハの流路エッチングが完了すると、ポリシリコンが1部分のHFに対する10部分の $\text{HNO}_3$ の混合物を用いて室温で除去され、そしてウェハが1部分のHFに対する1部分の $\text{H}_2\text{SO}_4$ 中で再び清澄された。

#### 【0066】

流路幾何学と細胞挙動との間の相互作用を調べるために、3つの異なる化学物質を各シリコンに対して使用した。第1に、標準的な異方性プラズマエッチ化学物質を使用して、STS<sup>24</sup>由来の切り替えられた加工プラズマ系中 $\text{SF}_6$ と $\text{CF}_4$ の混合物を用いて、シリコン中に長方形の溝を生成した。RIEラグとして公知の現象に起因して、より狭い溝は、深い溝よりも浅い。第2のプロセスは、STS由来の異なるプラズマ系を利用し、これは、U字型を有する等方性の溝を生成した。このプロセスは等方性であるが、溝の拡大は、最初に記載された等方性パイレックス（登録商標）エッチングプロセス中で経験されるほど、過酷ではない。これらの両方のプラズマエッチングの場合、溝は、 $20\mu\text{m}$ のわずかな深さでエッチングされた。第3のプロセスであるKOH（ $\text{H}_2\text{O}$ 中で45%w/w、 $88^\circ\text{C}$ ）中の異方性エッチングに関して、上記の二酸化ケイ素中間層が使用される。第1に、二酸化ケイ素層は、HFエッチングを使用して室温でパターン化される。KOHプロセスは、最初の2つの製法それぞれによって生成される長方形またはU字型よりも、角度を付けられた側面壁を生成する。結晶配向性の機能としてのKOHエッチングプロセスの異方性特性に起因して、 $\langle 111 \rangle$ 配向性の結晶平面は、角度を付けられた側面壁に沿って曝露される。このプロセスによって生成される流路の自己制限性質に起因して、溝の深さは $10\mu\text{m}$ までに制限された。シリコンウェハのエッチングの完了後、フォトレジストの全ての層および二酸化ケイ素を除去し、そしてウェハを1部分の $\text{H}_2\text{SO}_4$ ：1部分の $\text{H}_2\text{O}_2$ 中で $140^\circ\text{C}$ で清澄し、続いて脱イオン水でリンスし、窒素ガスで乾燥させた。

#### 【0067】

このセットの実験について、シリコンおよびパイレックス（登録商標）ウェハの表面化学を変更することを試みなかった。プロセシングの前において、シリコンウェハは、均一に疎水性である一方で、パイレックス（登録商標）ウェハは、

一様に親水性であり、これらを、液体シーティングおよび定着性液滴形成の観測により決定した。プロセッシングの後、非エッチング表面は、これらの特徴づけを維持するように思われたが、チャンネル内の表面化学は、決定されなかった。

#### 【0068】

##### (動物)

成体雄性Lewisラット (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) (150~200gの重量) を、細胞ドナーとして使用した。動物を、実験用動物の世話についてのNIHガイドラインに従ってAnimal Facility of Massachusetts General Hospital中に収納した。それらは、任意のラット飼料および水を与えられ、そして12時間の明および暗サイクルで維持された。

#### 【0069】

##### (細胞単離)

雄性Lewisラットを、肝細胞ドナーとして使用した。HCを、Aikenら、J Pediatr Surg 25, 140 (1990) ; Seglen PO Methods Cell Biol 13, 29 (1976) の前述の通りの2工程のコラゲナーゼ灌流手順の改変を用いて単離した。手短には、動物を、Nembutal Sodium Solution (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) (50mg/kg) を用いて麻酔し、そして腹部を滅菌様式で調製した。正中腹部切開を行い、そして肝臓下大静脈を、16ゲージ血管カテーテル (Becton Dickinson) を用いてカニューレ挿入した。門脈を、切開して、逆行流出を可能にし、そして肝上下大静脈を結紮した。灌流を、最初、流速29ml/分にて無カルシウム緩衝液を用いて5~6分間実施し、次いで、コラゲナーゼタイプ2 (Worthington Biomedical Corp., Freehold, NJ) を含有する緩衝液を用いて37℃にて実施した。肝臓は、細胞該マトリックスの適切な消化の後興奮され、そしてWilliam's E培地 (Sigma, St. Louis, MO) 中で補充しながら機械的に攪拌し、単一の細胞懸濁液を産生した。この懸濁液を、300ミクロンメッシュを通して濾過し、そし

て50gにて4℃での2分間の遠心分離によって2つのフラクションに分離した。生存可能なHCフラクションを含有するペレットを、William's E培地中で再懸濁し、そして等濃度Percoll遠心分離によってさらに精製した。次いで、生じたペレットを、Hepatocyte Growth Medium中で再懸濁し、そしてHCの細胞数および細胞生存を、トリパンブルー排除試験を用いて決定した。

#### 【0070】

内皮細胞を、ラット灰微少血管から得、そしてそれらを、製造供給元のVascular Endothelial Cell Technologies (Rensselaer, NY) から直接購入した。

#### 【0071】

(肝細胞培養培地)

1gのピルビン酸ナトリウム (Sigma, St. Louis, MO) および1%のグルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) で補充したWilliam's E培地を、細胞単離プロセスの間使用した。プレーティング培地を10%の胎児ウシ血清、1%のペニシリン-ストレプトマイシン、44mMの炭酸水素ナトリウム、20mMのHEPES、10mMのニアシアミド、30 $\mu$ g/mlのL-プロリン、1mMのアルコールビン酸2ホスフェート、0.1 $\mu$ Mのデキサメタゾン (Sigma)、インシュリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム (5mg/L-5mg/L-5 $\mu$ g/L、Roche Molecular Biomedicals, Indianapolis, IN) ならびに20ng/mlの上皮増殖因子 (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) で補充したDulbeccano改変イーグル培地 (Gibco BRL) であった。

#### 【0072】

(内皮細胞培養培地)

Dulbecco's改変イーグル培地 (Gibco BRL) を、10%の胎児ウシ血清、1%のペニシリン-ストレプトマイシン、25mgのアスコルビ

ン酸 (Sigma)、10mgのL-アラニン (Sigma)、25mgのL-プロリン (Sigma)、1.5  $\mu$ gの硫酸第2銅 (Sigma)、グリシン (Sigma) および1M HEPES緩衝溶液 (Gibco BRL) で補充した。培地を、8mgのアスコルビン酸で毎日補充した。

#### 【0073】

(非エッチングシリコンおよびパイレックス (登録商標) ウェハからの細胞付着およびリフティング)

シリコンおよびパイレックス (登録商標) を、内皮細胞および肝細胞の培養およびリフティングのための可能な基板として両方とも試験した。細胞播種の前に、パイレックス (登録商標) ウェハを、70%エタノール (Fisher, Pittsburgh, PA) で一晚滅菌し、そして滅菌リン酸緩衝化生理食塩水 (Gibco BRL) を用いて3回洗浄した。シリコンウェハを、第1に、アセトン中に1時間浸し、続いてメタノールリンスを15分間し、そして100%イソプロピルアルコール中で一晚滅菌した。ラット肺微少血管内皮細胞を、非コーティングパイレックス (登録商標) およびシリコン表面上に培養し、ならびにウェハを、ビトロジェン (vitrogen) (30  $\mu$ g/ml)、Matrigel (登録商標) (1%) またはゼラチン (10mg/ml) でコーティングした。一旦単離されると、細胞を、内皮細胞培養培地中で再懸濁し、 $26.7 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$  の濃度にてウェハに均一に播種し、そして5%  $\text{CO}_2$  および37°Cにて培養した。コンフルエンスに到達した後、ウェハからリフティングする内皮細胞の単層の能力を、細胞切屑を用いて脱離を促進することによって試験した。

#### 【0074】

ラット肝細胞をまた、非コーティングパイレックス (登録商標) およびケイ素ならびにvitrogen (30マイクログラム/ml および3マイクログラム/ml) およびMatrigel (1%) の薄い層および厚い層でコーティングされたウェハ上で、肝細胞シートを剥離させるために最適な方法を決定するために、培養した。一旦単離すると、肝細胞を、肝細胞増殖培地中に再懸濁し、 $1.3 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$  の密度でウェハ上に接種し、そして5%  $\text{CO}_2$  および

37℃で培養した。細胞付着および増殖を顕微鏡を使用して毎日観察し、そして細胞の剥離 (l i f t i n g) が自発的に起こった。

#### 【0075】

どの培養方法がインタクトな層において肝細胞および内皮細胞を剥離させるために最適かを決定した後、両方の膜を、10%緩衝化ホルマリン中に1時間固定し、そして組織学研究のために採取し、そしてこれらの肝細胞を免疫組織化学的に染色した。

#### 【0076】

(免疫組織化学的染色)

肝細胞単層膜を、10%緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてヘマトキシリン-エオシン染色および免疫組織化学的染色のために、標識化ストレプトアビジン-ビオチン法 (ラット標本用のLSAB2キット、DAKO、Carpinteria、CA) を使用して処理した。一次抗体は、ウサギ抗-アルブミン (ICN、Costa Mesa、CA) であった。3ミクロンの切片を調製し、そして脱パラフィン化 (d e p a r a f i n i z e) した。これらの切片を、非特異的染色を防ぐためにペルオキシダーゼ遮断緩衝液 (DAKO) で処理した。切片をリン酸緩衝化生理食塩水で希釈したアルブミンで染色し、次いでビオチニル化抗ウサギ抗体およびHRP結合体化ストレプトアビジンで染色した。切片を基質としてDABを用いて処理し、そしてヘマトキシリンで対比染色した。

#### 【0077】

(アルブミン産生)

肝細胞機能を評価するために、培養培地中のアルブミン濃度を、24時間毎に細胞脱落前5日間、Schwerveetら、Clinica Chemica Acta 163, 237 (1987) により記載されるような、酵素連結イムノソルベントアッセイ (n=5) を使用して測定した。簡単にいうと96ウェルマイクロプレートに抗ラットアルブミン抗体 (ICN) でコーティングした。非特異的応答を1%ゼラチン溶液でブロックした後、各サンプルをプレート上に接種し、そして1時間インキュベートした。次いでこれをペルオキシダーゼ結合体化抗ラットアルブミン抗体 (ICN) とともにさらに1時間インキュベートした。

最後に、基質を加え、そして吸光度を410nmでマイクロプレートリーダーを用いて測定した。標準曲線の $R^2$ は、 $>0.09$ であった。

#### 【0078】

(統計的分析)

全てのデータを平均 $\pm$ SDで表した。統計的分析を対比較t-検定 (paired t-test) を用いて行った。統計的有意性を各検定のp値が0.05未満の場合に決定した。

#### 【0079】

(エッチングされたケイ素およびパイレックス (登録商標) ウエハへの細胞付着)

内皮細胞および肝細胞をまた、エッチングされたケイ素およびパイレックス (登録商標) ウエハ上に接種した。細胞接種の前に、パイレックス (登録商標) ウエハを70%エタノール (Fisher) で一晚滅菌し、そして滅菌リン酸緩衝化生理食塩水 (Gibco BRL) で3回洗浄した。ケイ素ウエハを、最初に1時間アセトン中に浸漬し、次いで15分間メタノールでリンスし、そして100%イソプロピルアルコール中で一晚滅菌した。これらのウエハ上に、ラット肺微小血管内皮細胞を $26.7 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で接種するか、またはラット肝細胞を $111.3 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で接種した。これらの細胞を、5%CO<sub>2</sub>および37℃で培養し、そしてこれらの細胞の付着および増殖を毎日顕微鏡を使用して観察した。

#### 【0080】

(肝細胞シートのラット網への移植)

肝細胞を、vitrogen (30マイクログラム/ml) の薄層でコーティングされたケイ素ウエハ上で培養し、そしてシートで剥離させた。レトロルシン (retrorsine) は、後S段階および/またはG<sub>2</sub>段階において細胞を蓄積して肝細胞細胞周期にブロックを生じることによって正常な肝臓の再生を阻害することが公知である薬物である (Peterson J E J Pathol Bacteriol 89, 153 (1965))。この薬物を、2匹のラットの腹腔腔内に3mg/ml/100gの用量で、0日目に投与し、そして2

週間後に投与した。3週間後、門脈大静脈シャントを形成し、そして次の週に *vitrogen* コーティングケイ素 (30 マイクログラム/ml) 上で4日間培養した後に剥離した肝細胞シートを、ラット網の微小血管上に移植し、そして巻いて3次元円筒形状にし、60%肝切除を行った。肝細胞を有する巻かれた網を、4週間で採取し、そして移植の3ヶ月後に組織学を使用して分析した。

#### 【0081】

(結果)

(マイクロ機械加工)

マイクロ機械加工のテンプレートとして用いられる血管分岐ネットワークデザインの模式図を図9aに示す。このパターンは、「材料および方法」の節に記載したプロセスを用いてシリコンウエハおよびパイレックス (登録商標) ウエハに写される。これらのプロセスを用いて、代表的な溝の深さである、シリコン上の20ミクロンおよびガラス上の10ミクロンを得た。シリコンウエハ中にエッチングされた毛細管ネットワークの一部の光学顕微鏡写真を図9bに示す。図9cにおいて、最初に記載した異方性エッチングプロセスを用いてエッチングされた傾斜溝 (*angled trench*) の断面の走査電子顕微鏡写真を示す。このプロセスは、生存組織の優れた接着および剥離の増強を生じた。

#### 【0082】

(シリコンウエハおよびパイレックス (登録商標) ウエハからの細胞の増殖および剥離)

いくつかの異なる基板表面上の内皮細胞および肝細胞の接着および増殖を比較した。全てのパイレックス (登録商標) ウエハ (被覆 (コーティング) された、または被覆されていない) において、内皮細胞は、増殖し、そして4日内でコンフルエンスに達した。これらの細胞は、自然には剥離せず、そして掻きとられた場合、単一のシートとして剥離しない。さらに、コーティング (被覆) されていないシリコンウエハが内皮細胞とともに播種された場合、この細胞シートは、剥離の際に断片化した。一方で、*vitrogen* (30  $\mu$ g/ml)、*Matrigel* (1%)、およびゼラチン (10mg/ml) で被覆されたシリコン表面上に播種された内皮細胞は、機械的手段 (すなわち、細胞スクレイパー) の使用



では剥離せず、そして内皮細胞のインタクトな単層シートを提供した。観察の際、剥離した細胞シート上の3つのコーティングの効果に有意な差異は存在しなかった。

#### 【0083】

肝細胞はまた、全てのコーティングされたそして非コーティングされたパイレックス（登録商標）ウエハ上に付着し、そして広がる、そして自然には剥離せず、7日間増殖された後に引っ搔かれた場合、剥離しない。しかし、シリコンウエハ上に播種された場合、肝細胞は、全ての非コーティングウエハおよびコーティングウエハ上で自然には剥離しない。肝細胞シートは、3日後、非コーティングウエハから剥離するが、しかし非常に脆弱であり、そして容易に断片化する。薄いコーティングおよび薄くコーティングされた *vitrogen* 基質 ( $30\mu\text{g}/\text{ml}$  および  $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ) から剥離された単層は、培養中で4日後に剥離し、インタクトな肝細胞層を形成する。Matrigel (1%) から剥離した細胞は、培養中で5日後にシリコンウエハを被覆した。 *vitrogen* から剥離した細胞シートとMatrigel被覆ウエハから剥離した細胞シートとの間に該健常の差異は存在しなかった。

#### 【0084】

肝細胞および内皮細胞の両方の脱落した細胞層の組織学的評価により、期待される結果が表された。この両方のヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) 染色は、全ての細胞が生存可能であること、およびほとんどの細胞が有糸分裂していることを示した。内皮細胞は、最初に減弱され、そして単一細胞整列を形成することが示された。肝細胞の単層により、それぞれの細胞が、好酸性 *floculent* 細胞質、および明赤色の核小体を有する核（ネイティブな肝臓において見られるのと同様）を有する球状構成であることが示された。さらに、細胞接着は、内皮細胞よりも減弱された。従って、これらの結果は、それぞれの細胞型特異的機能を暗示する。生物学的システムにおいて、内皮細胞は、薄い平滑な外部表面の障壁および輸送チャネルを提供するように機能する。そのため、これらの細胞は、ここで最初に減弱され、そして単一細胞アレイにされることが観察される。この肝細胞は、より組織形成的で、そして単一細胞アレイがより少なく、そし

て丸い複数の層のアレイがより多い傾向を有することが見られる。

#### 【0085】

2、3、4および5日での肝細胞培養培地へのアルブミン分泌は、それぞれ、 $165.96 \pm 29.87$ 、 $164.44 \pm 17.22$ 、 $154.33 \pm 18.46$ 、 $115.47 \pm 18.09$  ( $\mu\text{g}/\text{日}$ 、グラフ1)であった。4日と5日との間では統計学的に有意差な差異が存在したが、2日、3日、4日の間では有意な差異は存在しなかった(対応のあるT検定により、 $p < 0.05$ )。ここで、このデータは、シリコンウエハ上で培養した細胞が、4日目までかなり一定のアルブミン産生速度を維持し得たことを示す。

#### 【0086】

さらに、脱落した肝細胞単層の免疫組織化学染色により、多くの細胞が、アルブミンについて陽性に染色され、このことは、シリコンウエハ上で肝細胞機能が維持されることをさらに示す。

#### 【0087】

(ラット大網への肝細胞シートの移植)

ラット大網へ移植した肝細胞シートのH&E染色は、全ての細胞が、生存可能であること、そして4週および3ヶ月での増殖を示したことを実証した。移植した肝細胞単層シートは、回収した場合、ほとんどの領域で5細胞層の厚さを超えていた。

#### 【0088】

この研究は、シリコン微細加工技術が、生存組織の大きいシートを形成するために利用され得ることを実証する。これにより、また、チャネルの管腔表面を裏打ちするための内皮細胞の生存を可能にする、チャネルの整列した分岐アレイをエッチングする可能性が実証される。さらに、操作された肝細胞組織および内皮細胞組織の組織化されたシートがシリコンウエハまたはパイレックス(登録商標)ウエハの表面から剥離され得、そしてコンパクトな3次元構成に折り畳まれ得ることが示された。この肝細胞シートは、ラットの大網の非常に血管化した表面に配置された。次いで、この構造は、操作された脈管系のモデルとして3次元シリンドーに丸め込まれた。血管新生した肝組織は、持続性移植片として形成され

た。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 aは、シリコン基板上の分岐パターンを作製するためのプロセスの概略図である。図1 bは、種々の深さのチャンネルを有する、より複雑な構造を作製するプロセスを示すより詳細な概略図である。

【図2】

図2 aは、単一入口から分岐し、次いで単一出口で再び合流する分岐構造を示す、エッジ表面の概略図である。図2 b、c おおび d は、図2 a の表面の異なるエッジ表面の断面の概略図である。

【図3】

図3 a - g は、3次元構造を形成するために構築される複合組織層の概略図である。

【図4】

図4 a、b および c は、組織層を作製するためのプロセスの概略図である。

【図5】

図5は、図4 a - c のプロセスによって形成される、構築された複合組織または器官の概略図である。

【図6】

図6は、図5の器官が、入口および出口の吻合によって、どのようにして流体に連絡され得るかを示す。

【図7】

図7は、誘導的に連結された（IPC）システムを使用してエッジングされたパターンの概略図である。

【図8】

図8は、シリコンウエハのU字型トレンチを加工するためのプロセスの概略図である。

【図9 a】

図9 aは、シリコンおよびパイレックス（登録商標）（pyrex）ウエハミ

クロ機械加工のために使用される、血管分岐ネットワークパターンを示す。

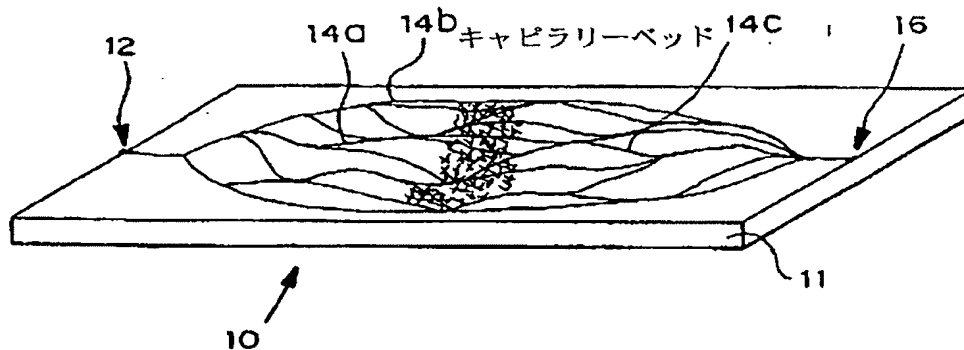
【図9 b】

図9 bは、図7に示されるプロセスを使用して、シリコンウエハにエッジングされた光学マイクログラフまたは毛細管ネットワークの一部を示す。

【図9 c】

図9 cは、アングルド側壁トレンチを形成するために使用される異方性エッジングプロセスの走査電子マイクログラフである。

【図1】



【図2】



図2 A



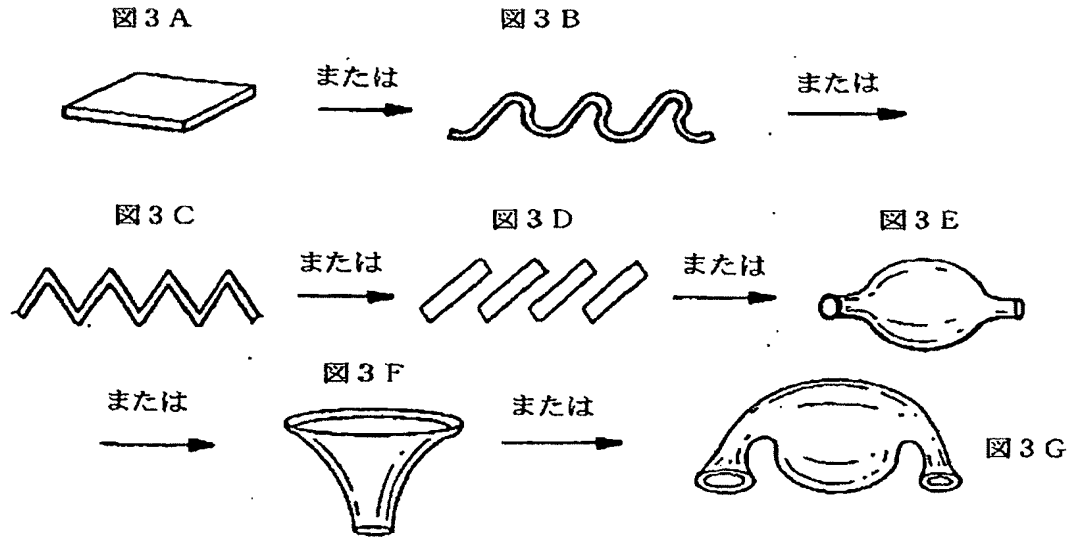
図2 B



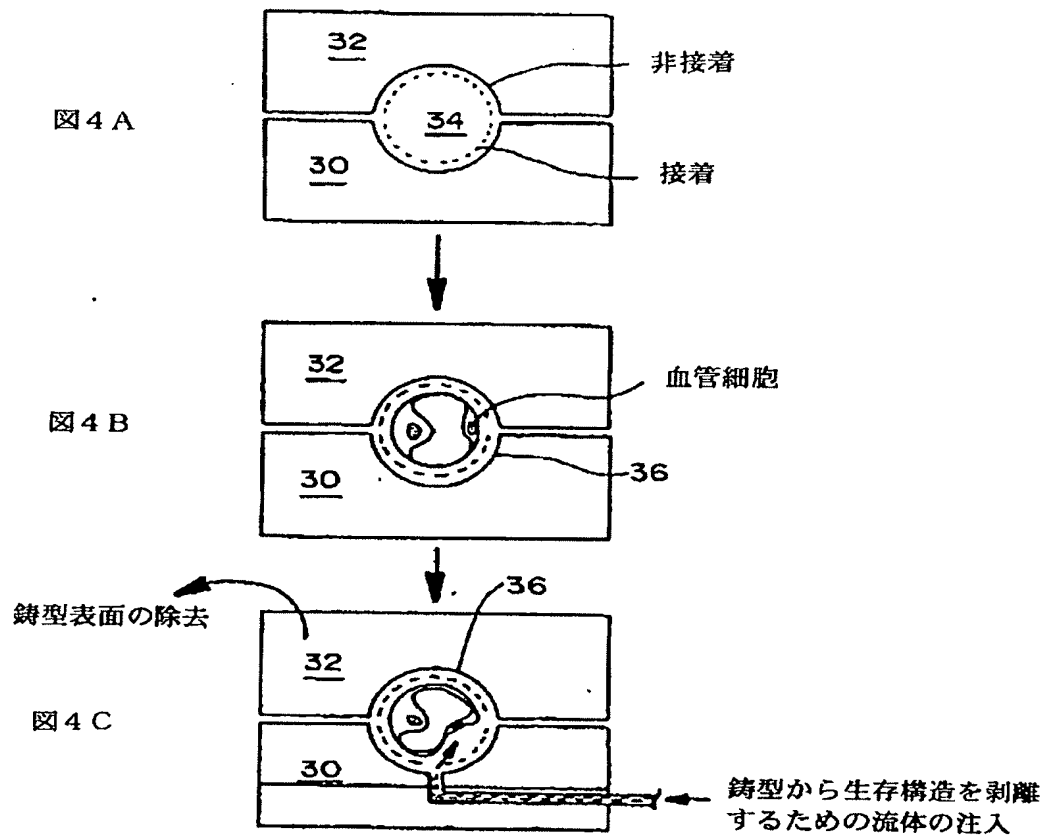
図2 C

深さ=約5ミクロン

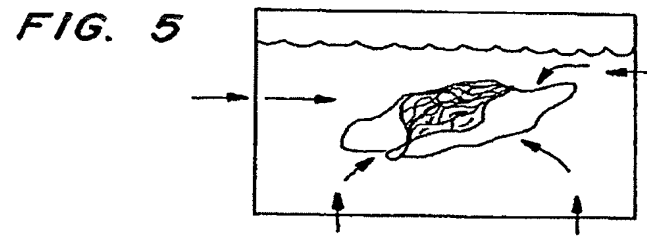
【図3】



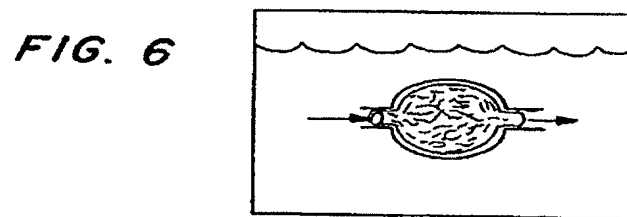
【図4】



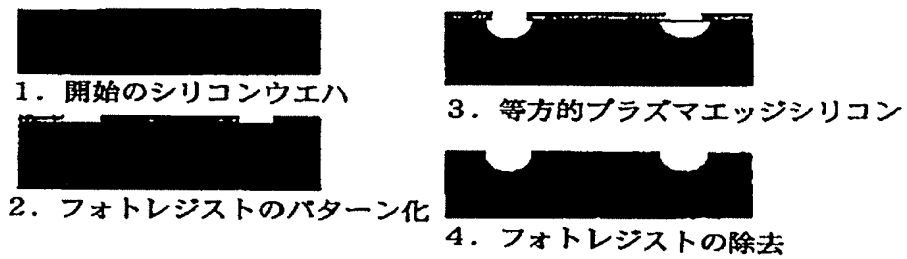
【図5】



【図6】



【図7】



シリコンウエハにU字型トレンチを加工するためのプロセス

【図8】



FIG. 8

【図9 a】

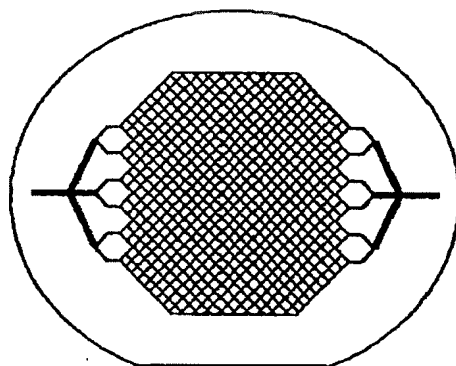


FIG. 9a

【図9 b】

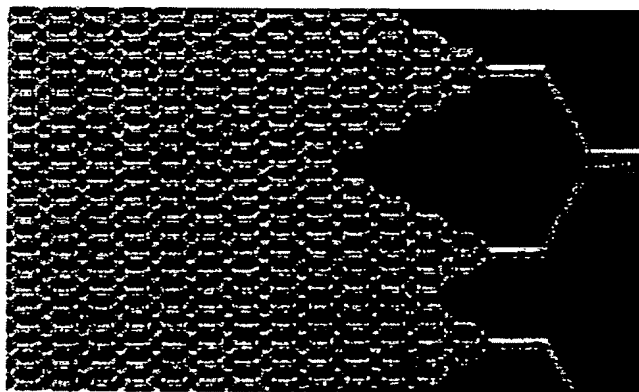
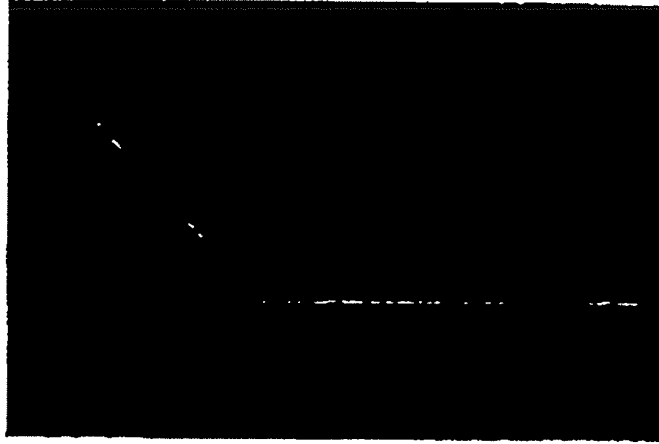


FIG. 9b

【図9 c】



シリコンおよびバイレックスウエハミクロ機械加工のために使用される、血管分岐ネットワークパターン。(b) 図7に示されるプロセスを使用して、シリコンウエハにエッチングされた光学マイクログラフまたはキャピラリーネットワークの一部。(c) アングルド側壁トレンチを形成するために使用される異方性エッチングプロセスの走査電子マイクログラフ (N. GerrishおよびJ. Ricker, Draper Laboratory)。



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No. PCT/US 00/11407		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/00 A61L27/38		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
A	US 5 686 289 A (HUMES H.D. ET AL.) 11 November 1997 (1997-11-11) the whole document	1-16
A	WO 96 40002 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 December 1996 (1996-12-19) cited in the application the whole document	1-16
A	FOLCH ALBERT ET AL: "Cellular micropatterns on biocompatible materials." BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 14, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 388-392, XP000961110 ISSN: 8756-7938 the whole document	1-16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document members of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 November 2000	Date of mailing of the international search report 06/12/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1601 Patentstr. 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3018	Authorized officer Moreau, J	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/11407

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEN BRABER E T ET AL: "Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces." JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 40, no. 2, May 1998 (1998-05), pages 291-300, XP000961118 ISSN: 0021-9304 cited in the application the whole document	1-16
P, A	WO 99 52356 A (CHARLOTTE MECKLENBERG HOSPITAL AUTHORITY) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/11407

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5686289 A	11-11-1997	US 5549674 A	27-08-1996
		AU 692191 B	04-06-1998
		AU 7970194 A	08-05-1995
		CA 2173594 A	27-04-1995
		EP 0746343 A	11-12-1996
		JP 9503941 T	22-04-1997
		WO 9511048 A	27-04-1995
WO 9640002 A	19-12-1996	CA 2222323 A	19-12-1996
		EP 0836453 A	22-04-1998
		JP 11507256 T	29-06-1999
WO 9952356 A	21-10-1999	AU 3552099 A	01-11-1999

## フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	タームコード(参考)
C 1 2 M 3/00		A 6 1 F 2/22	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW ), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, F I, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, I D, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, S K, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	4B029 AA01 BB11 CC02 CC08 4B065 AA90X AA93X BC41 BC50 CA44 4C097 AA01 AA14 AA15 AA20 AA26 BB01 CC01 CC11 DD15 MM01 MM02 MM03 MM04 MM05 MM06 MM07 MM08 SB10		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**